

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PT/BR 99/00096

REC'D 05 JAN 2000  
WIPO PCT

09/600594

*N9f*

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um Pedido de Patente de Invenção regularmente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial, sob o número PI 9804648-19de 23/11/98.

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Rio de Janeiro, em 06 de Dezembro de 1999.

*Gloria Regina Costa*  
Gloria Regina Costa  
Chefe do NUCAD



(Uso exclusivo do INPI)

<b>DEPÓSITO</b> Pedido de Patente ou de Certificado de Adição	depósito / /
Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)	

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

1.1 Nome: FUNDACAO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

1.2 Qualificação: Fundação pública

1.3 CGC/CPF:

1.4 Endereço completo: Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 - Rio de Janeiro

1.5 Telefone:

FAX :

continua em folha anexa

**2. Natureza:**

2.1 Invenção       2.1.1 Certificado de Adição       2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: patente de invenção

**3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**

Monitorização da obediência do paciente ao tratamento e da biodisponibilidade de drogas pela desproteínização de fluidos corpóreos

continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão do pedido nº. \_\_\_\_\_, de / /**

**5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:**

Nº de depósito \_\_\_\_\_ Data de Depósito / / (66)

**6. Prioridade - O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):**

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito
		/ /
		/ /
		/ /

continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**  
( ) Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: MILTON FERREIRA FILHO

7.2 Qualificação:

7.3 Endereço: Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900

7.4 CEP:

7.5 Telefone

continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**  
(art. 12 da LPI e item 2 do ato Normativo nº 127/97:

em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome e CPF/CGC: FRANCO, BHERING, BARBOSA E NOVAES

39.121.512/0001-41

10.2 Endereço: AV. RIO BRANCO, 103 - 12º ANDAR RIO DE JANEIRO RJ

10.3 CEP: 20040-004

10.4 Telefone 021 221-3757

11. **Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):**  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	26 fls.
X	11.2 Procuração	2 fls.	X	11.6 Reivindicações	4 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	0 fls.	X	11.7 Desenhos	4 fls.
	11.4 Doc. de contrato de trabalho	0 fls.	X	11.8 Resumo	2 fls.
	11.9 Outros (especificar):				0 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				39 fls.

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

RIO DE JANEIRO 18/11/1998

Local e Data

FRANCO, BHERING, BARBOSA E NOVAES  
39.121.512/0001-41

Assinatura e Carimbo

Título: Monitorização da bediência do paci nte a tratamento e da bi disp nibilidade de

Nome: VERA LÚCIA LUIZA

Qualificação:

Endereço: Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900

Cep:

Telefone:

Nome: EDUARDO WERNECK BARROSO

Qualificação:

Endereço: Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900

Cep:

Telefone:

Nome: ANDRÉ LUIS GEMAL

Qualificação:

Endereço: Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21045-900

Cep:

Telefone:

P 150444

MONITORIZAÇÃO DA OBEDIÊNCIA DO PACIENTE AO TRATAMENTO E  
DA BIODISPONIBILIDADE DE DROGAS  
PELA DESPROTEINIZAÇÃO DE FLUIDOS CORPÓREOS.

A presente invenção está relacionada a métodos de  
5 determinação da concentração de uma selecionada droga  
no corpo de um indivíduo com a finalidade de  
monitorizar os níveis da droga durante o acompanhamento  
clínico e/ou a obediência do paciente à medicação  
prescrita tanto em unidades clínicas quanto nos  
10 serviços de saúde pública. Os métodos são  
caracterizados por uma simplificada e efetiva etapa de  
desproteínização do fluido corpóreo seguida pela  
extração da droga e sua quantificação pelo uso de uma  
técnica precisa, tal como o ensaio colorimétrico ou o  
15 método de cromatografia líquida de alta resolução  
(HPLC).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

No campo da medicina, têm sido criados muitos  
medicamentos seguros e eficazes no tratamento de  
20 indivíduos doentes. Caracteristicamente, pacientes que  
fazem parte de programas de tratamento com uso de  
medicamentos são devidamente monitorizados. Métodos  
subjetivos e objetivos são usados para identificar  
sintomas persistentes e para implementar quaisquer  
25 mudanças que se façam necessárias durante o tratamento.

PIL 104440

A monitorização pode continuar enquanto durar o tratamento.

Atualmente, o método mais comum de monitorização da obediência dos pacientes à medicação é a observação clínica que envolve o aconselhamento individual e a supervisão pessoal de perto pelo médico. Os médicos observam os sinais fisiológicos e os sintomas ou sinais residuais da doença. Eles também prestam atenção às queixas do paciente com relação ao grau de alívio da dor e avaliam as mudanças fisiológicas durante o período. Esse método é altamente subjetivo e pode levar a potenciais erros.

Informação adicional sobre a obediência do paciente ao tratamento também pode ser obtida pelos métodos qualitativos de monitorização da urina como um procedimento laboratorial padrão denominado Imunoensaio enzima-multiplicada (EMIT). Através da utilização de um valor arbitrário limítrofe, esses métodos fornecem ao clínico indicações simples positivas ou negativas da possível presença ou ausência de uma droga não metabolizada ou de seus metabólitos na urina do paciente. A droga não metabolizada corresponde à medicação prescrita enquanto que os metabólitos são os derivados químicos que ocorrem naturalmente pela metabolização da medicação no corpo do paciente. No entanto, esses testes não fornecem informação sobre a quantidade ou o tempo do último uso da droga ou se a



P. 19804640

dose prescrita da medicação foi ingerida  
apropriadamente, desviada ou suplementada.

Os médicos que utilizam somente avaliação clínica  
e resultados qualitativos da investigação da droga na  
urina podem ser levados a criar problemas nos seus  
métodos de tratamento. A esse respeito, pode-se citar  
Fox, W. (Fox, W. (1990). "Drug combinations and  
bioavailability of rifampicin". Tubercle. 71: 241-5)  
que aconselha a realização de amostragem paralela, para  
análise no exterior, em levantamentos importantes sobre  
a eficácia do tratamento de tuberculose com multi-  
drogas para confirmar a determinação da  
biodisponibilidade pela urina. No texto mencionado, o  
termo "exterior" significa fora de países em  
desenvolvimento onde normalmente não são encontrados  
equipamentos analíticos caros.

Outro método de monitoramento algumas vezes usado  
é a medida direta da concentração da droga não  
metabolizada ou dos metabólitos ativos da droga no  
plasma ou em outros fluidos corpóreos. Esse método  
direto apresenta algumas limitações pois é caro e  
requer o uso de demorados procedimentos analíticos que  
utilizam alta tecnologia, tais como o método de  
cromatografia líquida de alta resolução e  
espectrometria de massa, na medida em que é necessário  
quantificar os metabólitos ativos e inativos.

Diversas tentativas para suplantar as dificuldades

P19804540

dos procedimentos analíticos sofisticados tem sido  
feitas. No documento EP 122 032 é descrito um método  
para medir a concentração de uma determinada droga no  
corpo de um indivíduo o qual consiste das etapas de  
coletar líquido através de meios que compreendem um  
corpo absorvente inerte, contendo uma substância que  
reage com a determinada droga, essa coleta sendo  
realizada próximo ao olho do paciente para recolher o  
líquido lacrimal, permitindo que ele entre em contato  
com a dita substância reagente por um período de tempo  
suficiente para o desenvolvimento da reação até que  
seja possível a detecção. É mencionado que esse método  
rapidamente fornece uma indicação do nível da dita  
droga no corpo porque o líquido lacrimal é menos  
complexo do que os outros fluidos corpóreos, tal como o  
sangue. No entanto, esse ensaio permite a detecção  
somente qualitativa ou semi-quantitativa da droga.

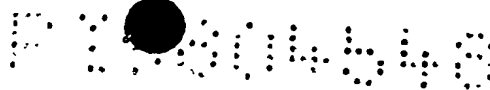
Apesar da simplicidade ser uma qualidade  
importante quando esse trata de métodos de  
monitorização, a acurácia do ensaio é crucial no  
controle de doenças tais como a tuberculose,  
especialmente para medir ínfimas quantidades de drogas  
presentes em fluidos corpóreos, tal como o sangue. Com  
relação a esse aspecto, é proposto no documento US 4  
656 141 a utilização da cromatografia líquida de alta  
resolução para detectar a presença de traços de  
compostos solúveis não fluorescentes, cada um tendo

P 1:30:44:0

pelo menos um átomo de hidrogênio lábil pela adição de quinona não fluorescente a qual pode ser reduzida a hidroquinona fluorescente e irradiar, na presença de oxigênio, a solução resultante com uma quantidade de energia luminosa suficiente para reduzir a quinona a hidroquinona.

Os métodos quantitativos e analíticos devem ser preferencialmente usados repetidas vezes para acompanhar o paciente e assegurar que ele está realmente ingerindo, de maneira adequada, as quantidades prescritas da medicação e respondendo como esperado. Mais do que isso, quando se trata de campanhas de Saúde Pública, a confiança na monitorização do tratamento é crucial. O Programa de Controle da Tuberculose pode ser citado como um exemplo representativo dessa abordagem e a rifampicina como exemplo de uma droga que é altamente potente e largamente usada no tratamento da tuberculose.

Igualmente importantes são os acompanhamentos eficazes da performance de tratamentos com outras drogas. Exemplos disso são as drogas anti-retrovirais, tais como os inibidores de proteinase e de transcriptase inversa, por exemplo 2',3'-dideoxiinosina (ddI), 2',3'-dideoxicitidina (ddC) or 3'-azido-2,3'-dideoxitimidina (AZT) (ver Frijus-Plessen N., Michaelis H.C., Foth H. e Kahl G.F. (1990). "Determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxycytidine, 3'-



fluoro-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in biological samples by high-performance liquid chromatography". Chrombio. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 534: 101-107), drogas anti-fúngicas, por exemplo itraconazol que também é usado na quimioterapia anti-leishmaniose (Anon: British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party: Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. The Lancet. Vol. 337. pp. 1577-1580. 1991) ou drogas à base de antimônio, que é a droga anti-leishmaniose mais usada (World Health Organization. Tropical Disease Research. Twelfth Programme Report. World Health Organization. Geneva. Switzerland. Pp 139.1995).

No caso de pacientes com tuberculose, há um crescente interesse na determinação dos níveis sorológicos das principais drogas anti-tuberculose, em particular a rifampicina que é uma das principais medicações utilizadas. Os métodos de ensaio mais comuns para a rifampicina são o colorimétrico, o microbiológico e o que utiliza a cromatografia líquida de alta resolução. Inicialmente, os ensaios microbiológicos foram os mais usados e empregavam os microorganismos *Sarcina lutea* ou *Staphylococcus aureus*. Exemplos dessa técnica estão descritos em: Furesz S., Scotti, R., Pallanza R., Mapelli E. (1967). "Rifampicin: A new rifampicin. III Absorption, distribution and elimination in man". *Arzneim-Forsch.*

P 1004640

17: 534-7; Boman, G. (1974). "Serum concentration and half-life of rifampicin after simultaneous oral administration of aminosalicic acid or isoniazid". Europ J Clin Pharmacol. 7: 217-25; Dickinson, J.M., Aber, V.R., Allen, B.W., Ellard, A., Mitchison, D.A. (1974). "Assay of rifampicin in serum". J Clin Path. 27: 457-62; Buniva, G., Pagani, V., Carozzi, A. (1983). "Bioavailability of rifampicin capsules". Int J Clin Pharmacol Therapy Toxicol. 21: 404-9; Immanuel, C., Jayasankar, K., Narayana, A.S.L., Saema, G.R. (1985). "Self-induction of rifampicin metabolism in man". Indian Med Res. 82: 381-7. No entanto, a precisão desses métodos geralmente deixa a desejar quando comparado com métodos utilizando HPLC.

15 Os ensaios colorimétricos chamam a atenção pela facilidade da sua realização. Os procedimentos desses métodos estão descritos em: Maggi, N., Furesz, S., Pallanza, R., Pelizza G. (1969). "Rifampicin desacetylation in the human organism". *Arzneim-Forsch.* 19: 651-4; Sunahara, S., Nakagawa, H. (1972). "Metabolic study and controlled clinical trials of rifampicin". *Chest.* 61: 526-32; Jeanes, C.W.L., Jessamine, A.G., Eidus, L. (1972). "Treatment of chronic drug-resistant pulmonary tuberculosis with rifampicin and ethambutol". *Canad Med Ass J.* 106: 884-8; Brechbuhler, S., Flueher, H., Riess, W. (1978). "The renal elimination of rifampicin as a function of the

P 19.04b40

oral dose". *Arzneim-Forsch.* 28: 480-3; McConnell, J.B.,  
Smith, H., Davis, M., Williams, R. (1979). "Plasma  
rifampicin assay for an improved solvent extraction  
technique". *Br J Clin Pharmac.* 8: 506-7; Israili, Z.H.,  
5 Rogers C.M., El-Attar, H. (1987). "Pharmacokinetics of  
antituberculosis drugs in patients". *J Clin Pharmacol.*  
27: 78-83.

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)  
vem sendo usada na determinação da rifampicina e de  
10 seus metabólitos em separado. Os procedimentos de HPLC  
estão descritos em: Goucher, C.R., Peters, J.H.,  
Gordon, G.R., Murray, J.F., Ichikawa, W., Welch, T.M.,  
Gelber, R.H. (1977). "Chemical and bacteriological  
assays of rifampicin, rifampicin-quinone and  
15 desacetylrifampicin". 12th U.S.-Japan Joint Conference  
on Leprosy. Boston. Ma. Sept 27-29, 1977. pp. 47-59;  
Lecaillon, J.B., Febvre, N., Metayer, J.P., Souppart,  
C. (1978). "Quantitative assay of rifampicin and three  
of its metabolites in human plasma, urine and saliva by  
20 high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr.*  
145: 319-24; Ratti, B., Rosina-Parenti, R., Toselli  
A., Zerrili, L.F. (1981). "Quantitative assay of  
rifampicin and its metabolite 25 desacetyl-rifampicin  
in human plasma by reversed-phase high-performance  
25 liquid chromatography". *J Chromatogr.* 225: 526-31;  
Guillaumant, M., Leclercq, M., Forbert, Y., Guise, B.,  
Harf, R. (1982). "Determination of rifampicin,

P19814640

- desacetyl rifampicin, isoniazid and acetylisoniazid by high performance liquid chromatography: Application to human serum extracts, polymorphonucleocytes and alveolar macrophages". *J Chromatogr.* 232: 369-76; Acocella, G., Nonis, A., Gialdroni-Grassi, G., Grassi, C. (1988). "Comparative bioavailability of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy". *Am Rev Respir Dis.* 138: 882-5; Ishii, M., Agata, H. (1988) "Determination of rifampicin and its main metabolites in human plasma". *J Chromatogr.* 426: 412-6; Nau, R., Prange, W.H., Menck, S., Kolenda, H., Visser, K., Seydel, J.K. (1992). "Penetration of rifampicin into the cerebrospinal fluid of adults with uninflamed meninges". *J Antimicrob Chemother.* 29: 719-24; Chouchane, N., Barre, J., Toumi, A., Tillement, J.P., Benakis, A. (1995). "Bioequivalence study of two pharmaceutical forms of rifampicin capsules in man". *Eur J Drug Metab Pharmacokin.* 20: 315-20.

Apesar de úteis no fornecimento de informação relativa ao status do paciente e da sua obediência ao tratamento, os métodos de monitorização clínica descritos acima, ou seja, entrevistas com o paciente, medida direta da droga no plasma e determinação quantitativa da droga na urina, têm apresentado respostas diferentes que limitam sua utilidade em

P. I. 804640

programas de tratamento a longo prazo. Por outro lado, apesar de serem eficientes, os ensaios complexos com muitas etapas de extração da droga dos fluidos corpóreos, por exemplo HPLC, requerem equipamento e materiais caros e pessoal especializado os quais não são normalmente encontrados em pequenos hospitais ou laboratórios de campo, principalmente em países em desenvolvimento. Mais do que isso, as perdas de material que está sob análise ocasionadas pelo uso de várias etapas de extração levam a valores de concentração mais baixos e conseqüentemente a resultados errados.

Dessa forma, persiste a necessidade de métodos de monitorização da obediência do paciente ao tratamento sem as desvantagens dos métodos conhecidos acima mencionadas mas que tenham sensibilidade e especificidade suficientes para detectar traços de substâncias presentes em fluidos corpóreos complexos. Tais métodos de monitorização irão ajudar os médicos tanto a prescrever doses adequadas da medicação quanto a monitorizar os pacientes, assegurando que eles estejam ingerindo as quantidades prescritas de medicação. Assim, a presente invenção objetiva prover tais métodos aperfeiçoados.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da presente invenção é fornecer um



## P I 0 0 4 4 0

dideoximitidina (AZT), os solventes polares são usados, em particular a água.

O anti-oxidante usado na etapa de desproteínezacão também é amplamente conhecido daqueles versados na técnica e é utilizado para retardar a ocorrência de reações de oxidação. O ácido ascórbico pode ser citado como um exemplo representativo.

A concentração da droga é medida por uma técnica apropriada. Métodos colorimétricos e cromatográficos por HPLC são os preferidos (por exemplo, ver McConnell, J.B., Smith, H., Davis, M., Williams, R. "Plasma rifampicin assay for an improved solvent extraction technique. Br J. Clin Pharmac. 8:506-507. 1979; Acocella, G., Nonis, A., Gialdroni-Grassi, G., Grassi, C. "Comparative bioavailability of isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide administered in free combination and in a fixed triple formulation designed for daily use in antituberculosis chemotherapy". Am Rev Respir Dis. 138: 882-5. 1988.; Ishii, M., Agata, H. "Determination of rifampicin and its main metabolites in human plasma". J Chromatogr. 426: 412-6. 1988; Vanakoski, J., Mattila, M.J., Vainio, P., Idänpään-Heikkilä, J.J. and Törnwall. "150 mg fluconazole does not substantially increase the effects of 10 mg midazolam or the plasma midazolam concentrations in healthy subjects". Int J Clin Pharmacol Ther. 33(9): 518-523. 1995; Frijus-Plessen N., Michaelis H.C., Foth

método de determinação quantitativa da concentração de drogas presentes em fluidos corpóreos com a finalidade de monitorizar os níveis da droga praticados tanto no tratamento clínico individual como nos programas de Saúde Pública e da obediência ao tratamento com a medicação prescrita. A monitorização dos níveis da droga é obtida através de ensaios quantitativos que permitem a detecção de drogas presentes em fluidos corpóreos em concentrações abaixo de 0.3 µg/ml. O método é caracterizado por uma etapa de desproteïnização prévia a qual propicia a recuperação de pelo menos 97% da quantidade da substância em análise presente no fluido corpóreo, isto é, fazendo a desproteïnização na presença de ZnSO<sub>4</sub> é possível retirar, com eficiência, a droga que tenha ficado aderida às proteínas contidas no fluido corpóreo. Ressalta-se o fato de que o método da invenção é especialmente útil na determinação da droga presente no sangue pois este contém muito mais proteína do que outros fluidos biológicos tais como urina, saliva ou fluido lacrimal.

Uma concretização da presente invenção é um método para a determinação do nível da droga utilizando uma etapa simplificada e efetiva de desproteïnização a partir de fluidos corpóreos, tais como o plasma, sangue, urina, saliva ou fluido lacrimal seguida pela extração da droga e sua quantificação usando uma

técnica acurada, como por exemplo os ensaios colorimétrico e HPLC.

Uma particular concretização refere-se a um método para quantificar rifampicina com a finalidade de monitorizar os níveis dessa droga em fluidos corpóreos bem como a um kit de monitorização do tratamento da tuberculose com base na determinação da concentração da rifampicina em fluidos corpóreos.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

10 Figura 1 mostra a reprodutibilidade e acurácia do método da presente invenção representadas por cromatogramas de HPLC de misturas sintéticas de rifampicina com fluidos corpóreos: (A) rifampicina em plasma nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,13 e 15 1,56  $\mu\text{g/ml}$ ; (B) várias amostras de mistura sintética de rifampicina com saliva na concentração de 2.0  $\mu\text{g/ml}$ ; (C) várias amostras de mistura sintética de rifampicina em urina a uma concentração de 18  $\mu\text{g/ml}$ .

Figura 2 mostra a reprodutibilidade e acurácia do método da presente invenção representadas por 20 cromatograma de HPLC de uma mistura sintética de 2',3'-dideoxicitidina (ddC), 2',3'-dideoxiinosina (ddI) e 3'-azido-2,3'-dideoxitimidina (AZT) com plasma na concentração de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

25 Figura 3 mostra a reprodutibilidade e acurácia do método da presente invenção representadas por

P 1004b40

cromatograma de HPLC de itraconazol em plasma nas concentrações de 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µg/ml.

FIGURAS 4 A E 4B ilustram um conjunto de curvas padrão que demonstram a linearidade da função  $(x, y)$  representada pela Lei de Beer para a faixa de 0.39 to 25 µg/ml de rifampicina em plasma, e a reprodutibilidade do método da presente invenção por colorimetria a 340 nm.

Figura 5 ilustra a utilidade do método da presente invenção em estudos farmacocinéticos com rifampicina, mostrando a variação da concentração de rifampicina em plasma medida a intervalos de tempo, como indicado na figura, em dois pacientes HIV positivos com tuberculose.

#### 15 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Nos programas de manutenção de tratamento, a medicação e a dose devem ser prescritos com base em diversos fatores. Estes normalmente incluem a gravidade e duração da doença, as quantidades e os tipos das 20 medicações anteriormente utilizadas, a história médica, o sexo do paciente, possibilidade de gravidez, peso do paciente e ingestão de outras medicações terapêuticas simultaneamente. Acrescente-se o fato de que, em certos casos, o agente patogênico pode desenvolver um grau 25 significativo de resistência à droga ou combinações terapêuticas com a mesma e, em consequência, a perda de

P 19804648

sensibilidade à dita droga. Neste caso, a regularidade na ingestão da droga é de grande importância.

Para determinar a obediência do paciente à dose de medicação prescrita, amostras de fluido corpóreo do paciente, por exemplo urina ou sangue, são retiradas do paciente de forma aleatória, sendo medida a concentração da droga não metabolizada e/ou de seus metabólitos. De fato, as concentrações de drogas antifúngicas no sangue são medidas tanto para verificar que tais concentrações estão num nível adequado como para evitar indesejáveis efeitos cotaterais (Anon: British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party: Laboratory monitoring of antifungal chemotherapy. The Lancet. Vol. 337. pp. 1577-1580. 1991).

Particularmente no tratamento da tuberculose, a ingestão regular do medicamento é de fundamental importância. Na verdade, para se conseguir eliminar a tuberculose da lista dos problemas de saúde pública, é importante estabelecer programas de controle com um instrumental eficiente para acompanhar o tratamento. Isso pode ser realizado através de métodos capazes de detectar quantidades mínimas da droga ou de seus metabólitos nos fluidos corpóreos. Tais ensaios também podem ser utilizados em estudos de quimioterapia para determinar a eficácia de novas drogas ou posologias, particularmente se os medicamentos não estão sendo administrados sob supervisão direta.

## P. 04.04.0

A rifampicina, a isoniazida, a pirazinamida e o etambutol são os medicamentos mais eficazes no tratamento da tuberculose. A rifampicina e a isoniazida são consideradas as mais importantes dentre essas drogas de primeira linha. As rifampicinas são antibióticos produzidos pela bactéria *Streptomyces mediterranei* e, sendo uma substância anfótera, é solúvel tanto em solventes orgânicos como em água tendo pH ácido. Esta droga é metabolizada no fígado, e seu primeiro metabólito é a 25-desacetilrifampicina. A farmacocinética da rifampicina varia de acordo com a idade do paciente e é afetada por problemas renais e hepáticos. Em tais circunstâncias, a monitorização terapêutica da rifampicina precisa ser a melhor possível para a otimização da dose. Uma grande parte da rifampicina, tanto inalterada como na forma de seu principal metabólito, é excretada na bile (cerca de 80%) e apenas uma pequena fração é eliminada pelos rins.

Praticamente todos os métodos para determinar a concentração da rifampicina em fluidos corpóreos, por exemplo, o microbiológico, o colorimétrico e o HPLC, necessitam de um número razoável de etapas de extração para separar a rifampicina e seus metabólitos da mistura complexa. Tais etapas desempenham um papel importante na precisão do ensaio pois é necessário retirar a rifampicina e seus metabólitos que tenham

P 105446

ficado agregados às proteínas contidas nos fluidos corpóreos. Entretanto, nesses métodos, o tratamento de remoção dos componentes interferentes leva tempo e resulta em perdas das substâncias sob análise, ou seja, da rifampicina e particularmente dos seus metabólitos que se encontram presentes em quantidades mínimas.

De acordo com a presente invenção, uma única etapa de extração é necessária, como pré-tratamento, antes da detecção do nível da droga. Sulfato de zinco aquoso, um solvente apropriado e o fluido corpóreo a ser analisado são mecanicamente misturados e, após centrifugação, a fase sobrenadante desproteïnizada é cuidadosamente recuperada para determinar a concentração da droga e de seus metabólitos.

A separação de proteínas do fluido corpóreo para permitir a eliminação de interferentes antes da análise do teor da droga já é amplamente conhecida e utilizada. De fato, Frijus-Plessen e outros descreveram a utilização de uma etapa de desproteïnização em ensaios para determinar a concentração das drogas anti-retrovirais ddI, ddC and AZT (ver Frijus-Plessen N., Michaelis H.C., Foth H. e Kahl G.F. (1990). "Determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxycytidine, 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in biological samples by high-performance liquid chromatography". Chrombio. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 534: 101-107). As

P 10444

proteínas contidas no sangue são precipitadas pelo uso de uma solução saturada de sulfato de amônio. Na verdade, o efeito *salting out* sobre misturas contendo proteínas é um método bem conhecido e frequentemente usado na purificação de proteínas. Scopes, R.K. (Scopes, R.K. Protein Purification Principles and Practice. Second Edition. Springer-Verlag. New York. Chapter 3. Pp 50. 1988) descreveu que os sais mais efetivos utilizados na precipitação de proteínas pelo efeito *salting out* são aqueles contendo anions de múltipla carga, tais como sulfato, fosfato e citrato. Adicionalmente o autor citou que o cátion é relativamente menos importante e, mesmo assim que, para aumentar a eficiência da precipitação, devem ser usados íons monovalentes na seguinte ordem de eficácia  $NH_4^+ > K^+ > Na^+$ .

Apesar dessas afirmações, de acordo com a presente invenção, foi verificado que a separação de proteínas de misturas complexas, tais como sangue ou plasma, não é obtida eficazmente se não for utilizado sulfato de zinco. Na verdade, a separação, por precipitação, de proteínas interferentes de uma droga contida em um fluido corpóreo não é obtida quando é usada a solução saturada de sulfato de amônio na etapa de desproteïnização. Mais vantajoso ainda é o fato de ser utilizada, na presente invenção, uma concentração relativamente baixa de sulfato de zinco. A solução de



## P I N T A D O

sulfato de zinco pode variar de 0.1M até 5M, e preferencialmente de 0.2M até 1.0M.

Assim, o método completo de monitorização da obediência do paciente ao tratamento e da biodisponibilidade de drogas da presente invenção compreende as seguintes etapas: (1) mistura com agitação mecânica do fluido corpóreo com solução de sulfato de zinco, um solvente apropriado e, opcionalmente, um agente anti-oxidante para precipitar as proteínas, com a remoção da droga que tenha ficado agregada às mesmas; (2) centrifugação da mistura para se obter a separação de fases; (3) recuperação da fase sobrenadante que é utilizada para se determinar a concentração da droga através de uma técnica suficientemente precisa, tal como o método colorimétrico ou o método cromatográfico HPLC.

O solvente usado na etapa de desproteínização é conhecido e sua escolha depende das propriedades de solubilidade da droga que está sendo analisada. No caso da rifampicina e seus metabólitos, apesar da mistura acetonitrila/2-propanol (1:1) ser preferida, diversos solventes orgânicos podem ser usados tais como benzeno, tolueno, diclorometano, clorofórmio ou suas misturas. Com relação aos medicamentos à base de compostos de antimônio, itraconazol e inibidores de protease ou de transcriptase inversa, tais como 2',3'-dideoxiinosina (ddI), 2',3'-dideoxicitidina (ddC) ou 3'-azido-2,3'-

P10. 14648

H. e Kahl G.F. (1990). "Determination of 3'-azido-3'-deoxythymidine, 2',3'-dideoxycytidine, 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine in biological samples by high-performance liquid chromatography". Chrombio. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 534: 101-107).

No caso da rifampicina e de seus metabólitos, embora o método cromatográfico por HPLC possa ser utilizado, a colorimetria é o preferido por combinar simplicidade e precisão. A concentração da rifampicina é determinada por medidas espectrofotométricas da fase orgânica sobrenadante na faixa de 340 nm. Mas o método cromatográfico por HPLC. Neste caso, as condições de realização do ensaio também são facilmente encontradas na literatura, como a que foi citada acima. A figura 1 mostra, através de cromatogramas de HPLC, a reprodutibilidade e precisão do método da presente invenção, ou seja, a aplicação de uma etapa de desproteínização simplificada e com a máxima recuperação da rifampicina e de seus metabólitos.

As figures 2 e 3 mostram a reprodutibilidade e precisão do método da presente invenção representado por cromatogramas de HPLC de misturas sintéticas de 2',3'-dideoxycitidina (ddC), 2',3'-dideoxyinosina (ddI), 3'-azido-2,3'-dideoxithimidina (AZT) e itraconazol com fluidos corpóreos.

Para viabilizar o método de detecção do nível de

## P I T O R I A

rifampicina no fluido corpóreo da presente invenção, é fornecido um kit contendo soluções padrão de sulfato de zinco, solvente orgânico e fluido corpóreo, por exemplo padrões de plasma ou de soro contendo uma quantidade conhecida de rifampicina. As instruções de como proceder também podem ser fornecidas. Um exemplo típico da presente invenção consiste de uma solução de sulfato de zinco aquoso em uma concentração de 0,1M a 5M, um solvente orgânico selecionado do grupo acetonitrila/2-propanol (1:1), benzeno, tolueno, diclorometano ou clorofórmio ou de suas misturas e um conjunto de misturas de fluido corpóreo, por exemplo plasma, com rifampicina em diversas concentrações para se obter a curva padrão nas condições do usuário. Particularmente preferidos são uma solução aquosa de  $ZnSO_4$  em uma concentração de 0,2M até 1.0M e, como solvente, uma mistura de  $CH_3CN/CH_2CHOHCH_3$  (1:1).

As figuras 4 A e 4 B e Tabela 1 mostram curvas padrão obtidas por ensaio colorimétrico em misturas de rifampicina e plasma a diversas concentrações na faixa de 0.39 to 25  $\mu g/ml$  e  $\lambda = 340$  nm. Essas curvas padrão de extrato de plasma apresentam coeficientes de correlação de 0,9999 e recuperação média de pelo menos 98% de rifampicina, corroborando a precisão propiciada pela única etapa de pré-tratamento da presente invenção.

O presente método também é apropriado para a realização de estudos farmacocinéticos da rifampicina e

P19 74548

de seus metabólitos. A figura 5 mostra os teores de rifampicina no plasma de dois pacientes soropositivos para HIV com tuberculose, aos quais foram administrados 600 mg de rifampicina sendo o acompanhamento realizado no período de 24 horas após a administração da droga. A irregularidade da curva de um dos pacientes explica-se pelo fato de que o mesmo apresentava problemas hepáticos.

Tabela 1: Curvas padrão da rifampicina em plasma

Concentração (µg/ml)	Absorbância							Média	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7			
0.39	0.013	0.012	0.014	0.012	0.009	0.008	0.011	0.01128571	0.00213809	0.00668153
0.78	0.022	0.021	0.019	0.021	0.020	0.019	0.021	0.02042857	0.00113389	5.55052723
1.56	0.042	0.040	0.042	0.046	0.040	0.043	0.043	0.04228571	0.00205866	4.86846088
3.00	0.096	0.088	0.088	0.094	0.090	0.087	0.097	0.09142857	0.00415761	4.54738507
6.25	0.189	0.180	0.191	0.191	0.178	0.181	0.185	0.18500000	0.00544671	2.9441684
12.50	0.382	0.368	0.370	0.365	0.375	0.368	0.367	0.37071429	0.00587975	1.58605901
25.00	0.770	0.748	0.768	0.724	0.775	0.746	0.732	0.75185714	0.0197689	2.62934297
Coeficiente de Correlação	0.99997559	0.99998962	0.99983102	0.99991144	0.99986669	0.99998607	0.99994411			

As vantagens do método da presente invenção em comparação com as técnicas descritas na literatura são: uma mais rápida determinação do teor da droga presente em um fluido corpóreo mas mantendo a precisão necessária nesse tipo de análise; utilização de técnica mais simples que pode ser aplicada em centros hospitalares de menor porte e em laboratórios de campo e; custos mais baixos o que permite o seu uso em centros de saúde pública.

Os exemplos a seguir são ilustrativos da invenção e representam concretizações preferidas. Aqueles versados na técnica podem, usando práticas rotineiras de experimentação, empregar outros materiais e técnicas apropriados, tais como as substâncias de extração acima mencionadas e outros métodos de medida.

#### EXEMPLO 1

Este exemplo ilustra a determinação do teor de rifampicina em plasma usando ensaio colorimétrico.

500  $\mu$ l de plasma são misturados com 200  $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> 0.5M, 500  $\mu$ l de acetonitrila:2-propanol (1:1, v/v) e 0,5 mg/ml de ácido ascórbico em um misturador tipo vortex e centrifugados por cerca de 3 minutos a 3.500 rpm. A medida espectrofotométrica da fase orgânica sobrenadante permite a determinação do teor de rifampicina no plasma.

Este ensaio leva 15 minutos para ser realizado, o que é um tempo muito menor do que o utilizado nas

técnicas descritas na literatura. Além disso, por requerer um número de etapas de separação bem menor, reduz as perdas de material e não requer a utilização de equipamento mais caro e sofisticado e nem de pessoal altamente qualificado.

#### EXEMPLO 2

O propósito deste exemplo é mostrar a determinação do teor de rifampicina em plasma usando o procedimento por HPLC.

10 A 500  $\mu$ l de plasma, urina ou saliva contendo uma quantidade desconhecida de rifampicina são adicionados a 250  $\mu$ l de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5M, 1 ml de acetonitrila:2-propanol (1:1, v/v) e a 0.5 mg/ml de ácido ascórbico. A mistura é agitada mecanicamente por 5 minutos e, em  
15 seguida, centrifugada por 10 minutos a 3.500 rpm. Uma alíquota de 20  $\mu$ l da fase orgânica sobrenadante é retirada e injetada em uma coluna cromatográfica.

As condições de operação no cromatógrafo são: a fase móvel consiste de 38% de B em A, onde A = 0.1M  
20  $KH_2PO_4$  (10%  $H_2O$ ) e B =  $CH_3CN$ , pH = 3.5. A mistura é bombeada em condições de fluxo constante no valor de cerca de 2 ml/minuto sob uma pressão de cerca de 40 bar a temperatura ambiente, como por exemplo 30°C; a coluna tem a especificação de RP 18 10  $\mu$ m 250 x 4.6 mm; e a  
25 detecção é feita no comprimento de onda de 254 nm.

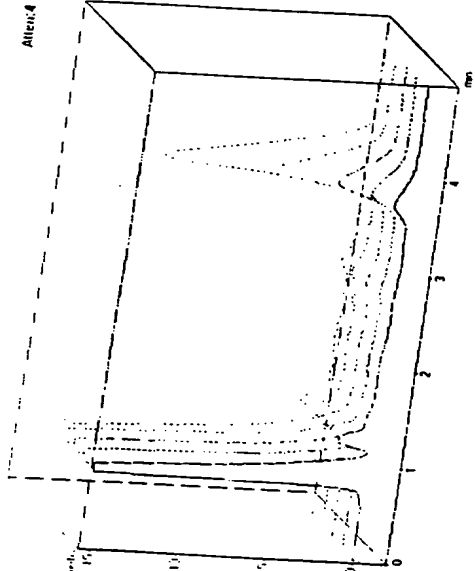
As amostras de calibração foram preparadas através da medida de uma solução de 20 $\mu$ l de rifampicina. Foram

## P I M E I R O

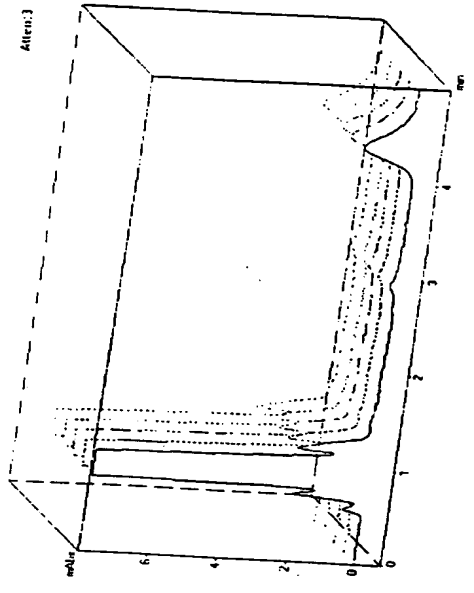
preparadas de três a seis amostras contendo 1.25 a 20 µg/ml de rifampicina. Os gráficos de calibração (pico versus tempo) são lineares. A completa calibração foi repetida diariamente. O tempo de retenção para a rifampicina foi de 4 minutos como mostrado na figuras 1.



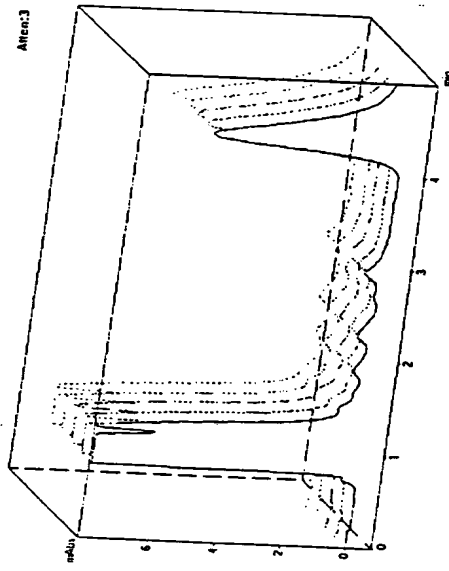
P 1380450



IA



IB



IC

FIGURA 1

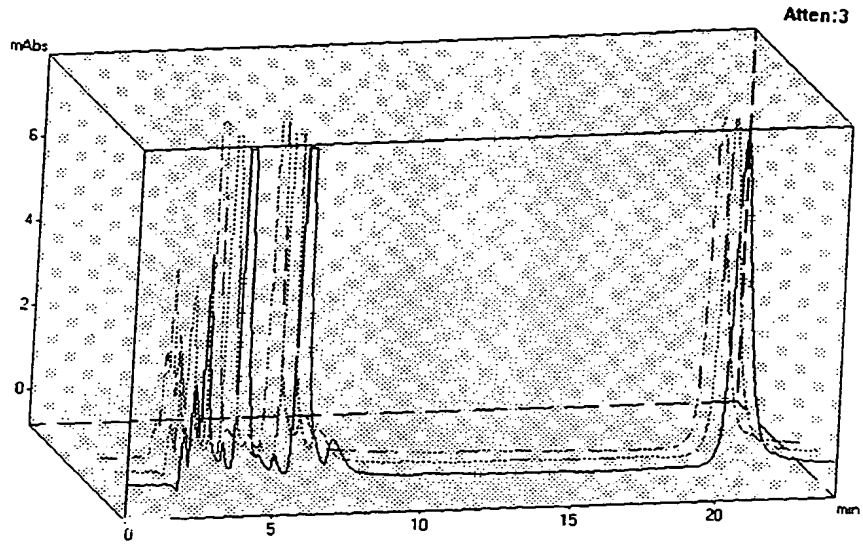


FIGURA 2

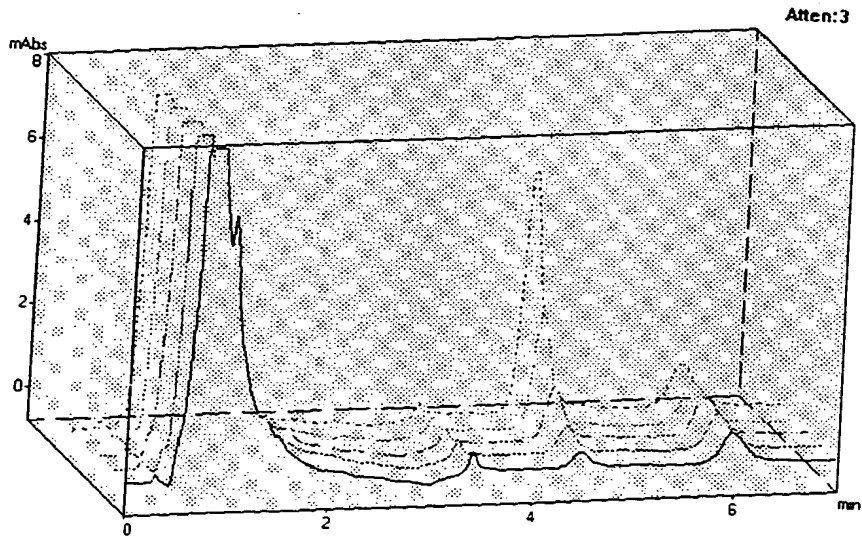


FIGURA 3

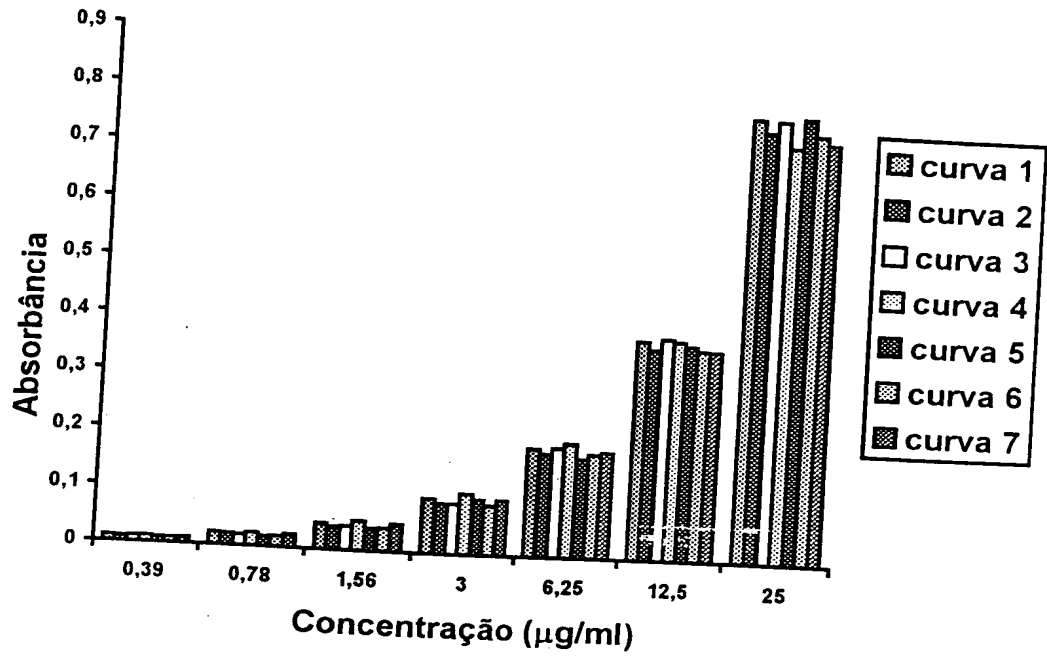


FIGURA 4A

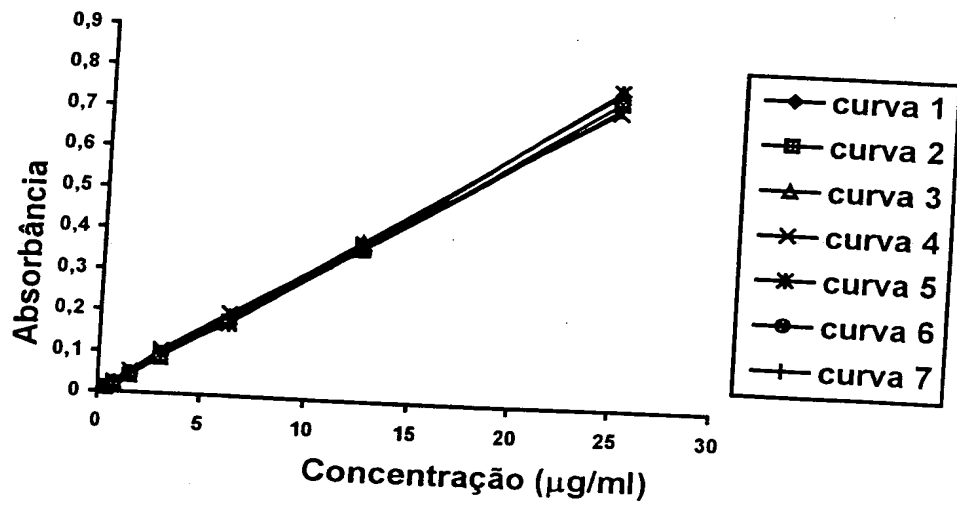


FIGURA 4B

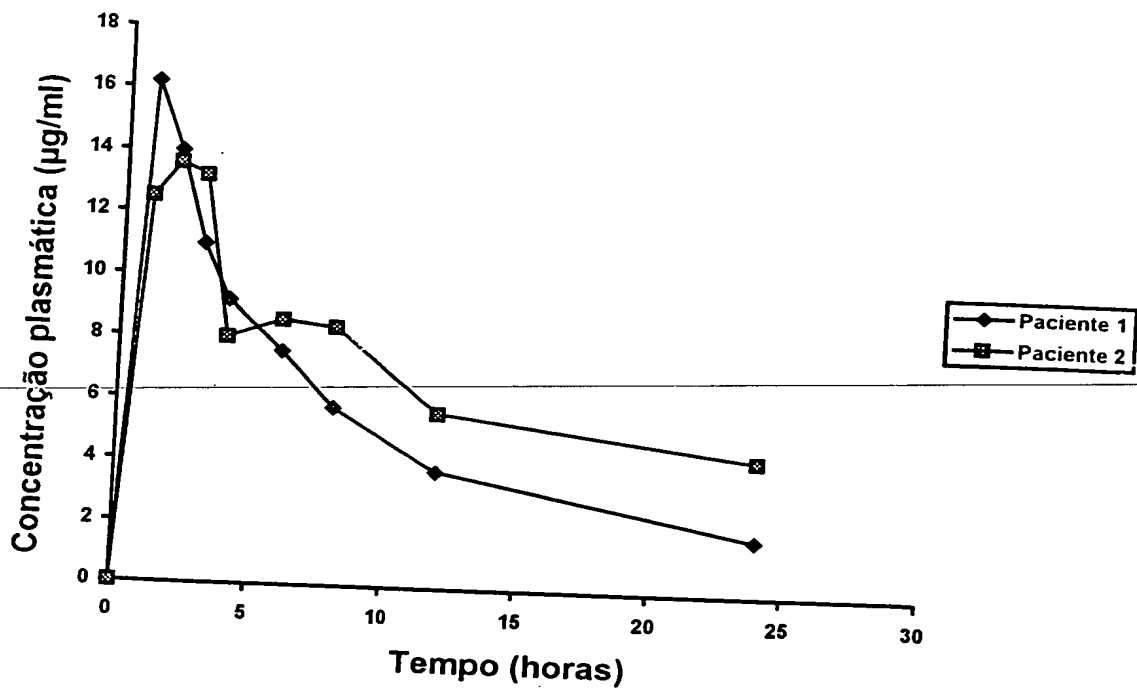


FIGURA 5

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de determinação da concentração de uma selecionada droga no corpo de um indivíduo com a finalidade de monitorizar tanto a obediência do paciente ao tratamento quanto a biodisponibilidade de drogas contidas em fluidos corpóreos caracterizado por compreeeder as etapas de:

(a) misturar e agitar mecanicamente o fluido corpóreo com solução de sulfato de zinco, um solvente apropriado e opcionalmente uma substância anti-oxidante para precipitar as proteínas, liberando a droga que tenha ficado agregada às mesmas;

(b) centrifugar a mistura para obter a separação de fases;

(c) recuperar a fase sobrenadante e proceder à medida da concentração da droga.

2. Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.1M até 5.0M.

3. Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pela concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.2M até 1.0M.

4. Método de acordo com as reivindicações 1 a 3 caracterizado pelo solvente apropriado ser um solvente polar, apolar ou suas misturas.

5. Método de acordo com a reivindicação 4

P 1804640

caracterizado pelo solvente apolar ser um solvente orgânico selecionado do grupo consistindo de acetonitrila/2-propanol (1:1), benzeno, tolueno, diclorometano, clorofórmio ou suas misturas.

5 6. Método de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo solvente polar ser selecionado do grupo consistindo de água, álcoois ou suas misturas.

7. Método de acordo com as reivindicações de 1 a 6 caracterizado pelo fato do ácido ascórbico ser a  
10 substância anti-oxidante usada na etapa (a).

8. Método de acordo com as reivindicações 1 a 7 caracterizado pelo fato da medida da concentração da droga ser feita por ensaio colorimétrico ou por método de cromatografia líquida de alta resolução.

15 9. Método de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 5 e 7 caracterizado pelo fato de que a rifampicina é a droga analisada.

10. Método de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 6 e 7 caracterizado pelo fato de que a droga a ser  
20 analisada é selecionada do grupo de compostos de antimônio, itraconazol e inibidores de proteinase ou transcriptase inversa.

11. Método de determinação da concentração da rifampicina no corpo de um indivíduo com a finalidade  
25 de monitorizar tanto a obediência do paciente ao tratamento quanto a biodisponibilidade de drogas contidas em fluidos corpóreos caracterizado por

compreender as etapas de:

(a) misturar e agitar mecanicamente o fluido corpóreo com solução de sulfato de zinco, um solvente orgânico selecionado do grupo consistindo de acetonitrila/2-propanol (1:1), benzeno, tolueno, diclorometano, clorofórmio ou suas misturas e opcionalmente uma substância anti-oxidante para precipitar as proteínas, liberando a droga que tenha ficado agregada às mesma;

(b) centrifugar a mistura para obter a separação de fases;

(c) recuperar a fase orgânica sobrenadante e proceder à medida da concentração da droga usando um ensaio colorimétrico ou método de cromatografia líquida de alta resolução.

12. Método de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato da concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.1M a 5.0M.

13. Método de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato da concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.2M a 1.0M.

14. Método de acordo com as reivindicações 11 a 13 caracterizado pelo fato de que o solvente usado na etapa (a) ser acetonitrila/2-propanol (1:1).

15. Método de acordo com as reivindicações 11 a 14 caracterizado pelo fato do ácido ascórbico ser a substância anti-oxidante usada na etapa (a).

16. Método de acordo com as reivindicações 11 a 15

P. 304b40

caracterizado pelo fato da concentração da rifampicina ser determinada por medida espectrofotométrica a 340 nm.

17. Kit para medir a concentração de rifampicina contida em um fluido corpóreo caracterizado por consistir dos seguintes reagentes:

(a) uma solução aquosa padrão de sulfato de zinco contendo uma substância anti-oxidante;

(b) um solvente orgânico selecionado do grupo consistindo de acetonitrila/2-propanol (1:1), benzeno, tolueno, diclorometano, clorofórmio ou suas mistura;

(c) padrões de sero contendo uma quantidade conhecida de rifampicina para preparar a curva padrão para as condições do usuário.

18. Kit de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato da concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.1M a 5.0M.

19. Kit de acordo com a reivindicação 18 caracterizado pelo fato da concentração da solução aquosa de sulfato de zinco variar de 0.2M a 1.0M.

20. Kit de acordo com as reivindicações 17 a 19 caracterizado pelo fato da substância anti-oxidante usada na etapa (a) ser ácido ascórbico.

21. Kit de acordo com as reivindicações 17 a 20 caracterizado pelo fato do solvente definido em (b) ser acetonitrila/2-propanol (1:1).



## RESUMO

MONITORIZAÇÃO DA OBEDIÊNCIA DO PACIENTE AO TRATAMENTO E  
DA BIODISPONIBILIDADE DE DROGAS  
PELA DESPROTEINIZAÇÃO DE FLUIDOS CORPÓREOS.

5           O objetivo da presente invenção é fornecer um  
método de determinação quantitativa da concentração de  
drogas presentes em fluidos corpóreos com a finalidade  
de monitorizar tanto a obediência ao tratamento com a  
medicação prescrita como os níveis da droga praticados  
10 no tratamento clínico individual e nos programas de  
Saúde Pública. A monitorização dos níveis da droga é  
obtida através de ensaios quantitativos que permitem a  
detecção de drogas presentes em fluidos corpóreos em  
concentrações abaixo de 0.3 µg/ml. O método é  
15 caracterizado por uma etapa de desproteínização prévia  
a qual propicia a recuperação de pelo menos 97% da  
quantidade da substância em análise presente no fluido  
corpóreo, isto é, fazendo a desproteínização na  
presença de ZnSO<sub>4</sub> é possível retirar, com eficiência, a  
20 droga que tenha ficado aderida às proteínas contidas no  
fluido corpóreo. Ressalta-se o fato de que o método da  
invenção é especialmente útil na determinação da droga  
presente no sangue pois este contém muito mais proteína  
do que outros fluidos biológicos tais como urina,  
25 saliva ou fluido lacrimal.

Uma concretização da presente invenção é um método para a determinação do nível da droga utilizando uma etapa simplificada e efetiva de desproteíntização a partir de fluidos corpóreos, tais como o plasma, sangue, urina, saliva ou fluido lacrimal seguida pela extração da droga e sua quantificação usando uma técnica acurada, como por exemplo os ensaios colorimétrico e HPLC.

Uma particular concretização refere-se a um método para quantificar rifampicina com a finalidade de monitorizar os níveis dessa droga em fluidos corpóreos bem como a um kit de monitorização do tratamento da tuberculose com base na determinação da concentração da rifampicina em fluidos corpóreos.